



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DANIELLA PEREIRA DA SILVA

**INFLUÊNCIA DE SUBSTRATOS ALTERNATIVOS NA FERMENTAÇÃO DE
KOMBUCHÁ PARA OBTENÇÃO DE MEMBRANA CELULÓSICA.**

RECIFE

2022

DANIELLA PEREIRA DA SILVA

**INFLUÊNCIA DE SUBSTRATOS ALTERNATIVOS NA FERMENTAÇÃO DE
KOMBUCHÁ PARA OBTENÇÃO DE MEMBRANA CELULÓSICA.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Eriane de Castro Lima

RECIFE

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Na scimento, CRB4/1743

Silva, Daniella Pereira da
Influência de substratos alternativos na fermentação de kombuchá para obtenção de membrana celulósica. / Daniella Pereira da Silva. – 2022.

55 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Tânia Lúcia Montenegro Stamford.
Coorientadora: Erilane de Castro Lima.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Recife, 2022.
Inclui referências.

1. Fermentação. 2. Celulose bacteriana. 3. Biopolímero. 4. Atividade antimicrobiana. I. Stamford, Tânia Lúcia Montenegro. (orient.). II. Lima, Erilane de Castro. (coorient.). III. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-212

DANIELLA PEREIRA DA SILVA

**INFLUÊNCIA DE SUBSTRATOS ALTERNATIVOS NA FERMENTAÇÃO DE
KOMBUCHÁ PARA OBTENÇÃO DE MEMBRANA CELULÓSICA.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Tânia Lúcia Montenegro Stamford.

UFPE

Prof^a. Dr^a. Norma Buarque de Gusmão

UFPE

Prof^o. Dr^o. Francisco Humberto Xavier Junior

UFPB

RECIFE, 24 DE AGOSTO DE 2022.

A todos que de alguma forma contribuíram nesse processo, aos meus professores que são exemplos e aos colegas de curso que assim como eu encerram uma difícil etapa da vida acadêmica.

Dedico-lhes

AGRADECIMENTOS

A Deus que me levantou todas as vezes que pensei em desistir, soprando fé em meu coração e abrindo tantas portas fazendo com que eu não perdesse a esperança, me guiando por um caminho de muitos aprendizados e conquistas.

Aos meus pais, pelo incentivo e pela confiança na minha capacidade. Mãe, obrigada por todo apoio todas as vezes que precisei me ausentar. Pai, eu sei que nunca estarei sozinha. À minha vó Ijacy todo meu carinho e amor. Ao meu irmão Diego pelo auxílio no inglês. À minha filha Maria Luísa, a razão de todo meu esforço, você é luz na minha vida, amo você.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Tânia Lúcia Stamford por ter acreditado e confiando na minha capacidade, por todo conhecimento que compartilhou comigo. A Prof^a Dr^a Thayza Stamford por me acolher com tanto carinho e me dar todo o suporte necessário para a conclusão desse trabalho. A minha coorientadora Prof^a Dr^a Erilane Machado pelo start desse projeto maravilhoso que tive o prazer de estudar. Vocês foram essenciais na minha formação!

Ao meu namorado Moacir Júnior, batizado carinhosamente de IC durante minha pesquisa. Sem você não teria conseguido, obrigada pelas fermentações concluídas, por manter ativa minhas Kombuchás, por enxugar minhas lágrimas e por me suportar. Eu sei que não foi fácil.

Aos meus colegas do LAMAP muito obrigada por todo conhecimento compartilhado. Em especial a Felipe Ravelly, por sempre me socorrer. Estamos juntos!

As minhas amigas da turma do mestrado em Biotecnologia, que sempre apoiamos umas às outras durante esse processo difícil de fazer ciência durante uma pandemia. Conseguimos!

Ao centro acadêmico de Vitória (UFPE-CAV) onde desenvolvi boa parte do meu projeto. Em especial ao técnico Silvio de Assis pelas dicas e troca de conhecimento.

Ao professore Marcos Lima pela disposição em ajudar, obrigada pela paciência e por ensinar o caminho. Ao professor Humberto Junior pelas minhas análises de FTIR e TG.

A todos os envolvidos do Departamento de Química Fundamental – DQF/UFPE. A técnica Elaine pela metalização das minhas amostras. A Mônica pela minha análise de MEV.

Ao doutorando Victor do departamento de engenharia civil pela análise de DRX.

A coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UFPE. Em especial a Klayton Cabral secretário do curso, por toda paciência, auxílio e apoio.

Aos membros da banca Professora Norma e professor Humberto, por terem aceitado participar e por suas valiosas contribuições.

A Capes pela bolsa concedida para tornar meu sonho realidade.

A todos, minha eterna gratidão!

"Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas."

- Marie Curie

RESUMO

Kombuchá é uma bebida milenar com alegação de propriedades funcionais, formada a partir de duas fases, uma líquida na qual se encontra uma complexa comunidade de microrganismos com alegação probiótica, e uma fase sólida constituída por uma membrana celulolítica produzida por parte dos microrganismos que também ficam aderidos. A celulose bacteriana (CB) produzida pela Kombuchá é um biopolímero produzido pela bactéria *Glucanobacter xylinus* que precisa de meio de cultivo caros para sua produção. A presente pesquisa teve por objetivo analisar a obtenção de biomembrana (membrana celulolítica) a partir da cultura simbiótica da bebida tipo Kombuchá utilizando como substrato resíduos agroindustriais de abacaxi e maçã, em diferentes concentrações (10, 20 e 30%). Inóculos da cultura inicial, fornecida por uma produtora de Kombuchá caseira, foram adicionados para fermentação nos substratos de resíduos agroindustriais previamente citados, sendo usado o chá verde como controle. O processo de fermentação foi acompanhado nos tempos 7,14 e 21 dias, a temperatura ambiente 28 ± 2 °C, em repouso. Sendo avaliados pH, sólidos solúveis totais, glicose e proteínas totais durante todo o processo fermentativo. A membrana de celulose bacteriana formada na fermentação foi removida da superfície do meio por pinças, seguida de lavagens para obter uma membrana purificada. Foi analisado o peso úmido e peso seco, sendo o abacaxi como melhor fonte de obtenção de CB, produzindo 3,30 g/L de massa seca em 14 dias de fermentação, apresentando pH 3,6 e consumo de glicose e proteína, 16,19 mg/dL e 6,62 mg/dL respectivamente. As CB foram avaliadas quanto suas características estruturais por espectroscopia na região do infravermelho obtendo picos semelhantes ao da celulose tipo I, microscopia eletrônica de varredura e sua cristalinidade próximos a 80% por difração de Raio X. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela técnica de microdiluição contra microrganismos patogênicos, tendo sido observada inibição 97,5% frente a cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. Mediante aos resultados obtidos pode-se concluir que o uso de substratos alternativos de baixo custo para obtenção de celulose bacteriana possui um potencial promissor.

Palavras-chave: Fermentação; Celulose bacteriana; Biopolímero; Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Kombucha is a millennial beverage with claimed functional properties, formed from two phases, a liquid phase in which a complex community of microorganisms with probiotic claims is found, and a solid phase consisting of a cellulolytic membrane produced by a part of the microorganisms that are also adhered. The bacterial cellulose (BC) produced by Kombucha is a biopolymer produced by the bacterium *Glucanobacter xylinus* that needs an expensive culture medium for its production. The present research aimed to analyze the obtention of biomembrane (cellulolytic membrane) from the symbiotic culture of Kombucha beverage using pineapple and apple agro-industrial wastes as substrate in different concentrations (10, 20, and 30%). Inoculum from the starter culture, provided by a homemade Kombucha producer, was added for fermentation on the previously mentioned agro-industrial waste substrates, and green tea was used as a control. The fermentation process was followed for 7, 14, and 21 days, at room temperature 28 ± 2 °C, at rest. pH, total soluble solids, glucose, and total proteins were evaluated during the whole fermentation process. The bacterial cellulose membrane formed in the fermentation was removed from the surface of the medium by tweezers, followed by washes to obtain a purified membrane. Wet weight and dry weight were analyzed, and pineapple was the best source to obtain CB, producing 3.30 g/L of dry mass in 14 days of fermentation, presenting pH 3.6 and glucose and protein consumption, 16.19 mg/dL and 6.62 mg/dL respectively. The CB were evaluated for their structural characteristics by spectroscopy in the infrared region, obtaining peaks like type I cellulose, scanning electron microscopy and its crystallinity close to 80% by X-ray diffraction. The antimicrobial activity was evaluated by the microdilution technique against pathogenic microorganisms, and a 97.5% inhibition was observed against the *Pseudomonas aeruginosa* strain. Based on the results obtained, it can be concluded that the use of alternative low-cost substrates to obtain bacterial cellulose has a promising potential.

Key words: Fermentation; Bacterial cellulose; Biopolymer; Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Kombuchá: SCOBY imerso em chá verde.	18
Figura 2 - Fluxograma do processo produtivo da Kombuchá.	26
Figura 3 - Estrutura linear da celulose.	27
Figura 4 - Celulose bacteriana da Kombuchá em chá verde.	28
Figura 5 - Planejamento experimental.	30
Figura 6 - Produção de celulose bacteriana em diferentes meios de cultivo durante 21 dias de fermentação, após secagem.	36
Figura 7 - Comportamento do pH nos meios de cultivos avaliados.	37
Figura 8 - Índice de refração dos meios alternativos durante o processo fermentativo da Kombuchá.	38
Figura 9 - Quantificação de glicose e proteína durante o processo fermentativo da Kombuchá.	40
Figura 10 - Espectro da difração de Raio-X da Biomembrana obtida em meio de chá verde (concentração de açúcar: 100g/L), 2θ (5° a 70°).	41
Figura 11 - Espectro da difração de Raio-X da Biomembrana obtida em meio de maçã (concentração da maçã: 20% v/v, concentração de açúcar: 100g/L), 2θ (5° a 70°).	42
Figura 12 - FTIR das amostras de celulose bacteriana obtidas em meios de cultura chá verde, resíduos de abacaxi e maçã.	44
Figura 13 - Micrografia Eletrônica de Varredura de celulose bacteriana obtida a partir da fermentação de Kombuchá em meios de cultivos alternativos: (A e B) CB controle chá verde; (C e D) CB Abacaxi e (E e F) CB Maçã.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ensaio da atividade antimicrobiana realizada em placa de 96 poços. ...	34
Tabela 2 - Dados do peso seco realizados durante os 21 dias de fermentação em meios de cultivos alternativos.....	35
Tabela 3 - Índice de inibição da viabilidade de microrganismo patogênicos frente a solução de celulose da Kombuchá em diferentes concentrações. Resultado apresentado em percentagem (%).	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - *American Type Culture Collection*

CB – Celulose de origem bacteriana

CIM – Concentração Inibitória Mínima

D.O – Densidade Ótica

DRX – Difração de Raio-X

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

pH – Potencial hidrogeniônico

UFC – Unidade Formadora de Colônias

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 CONCEITUAÇÃO E EVOLUÇÃO HISTÓRICA DA KOMBUCHÁ	18
3.1.1 Legislação	19
3.2 SCOBY PARA A PRODUÇÃO DA KOMBUCHÁ	20
3.3 PRODUÇÃO DA KOMBUCHÁ: CONSTITUIÇÃO E INGREDIENTES.....	21
3.3.1 Chás e infusões variadas	21
3.3.2 Açúcares	22
3.3.3 Substratos alternativos	23
3.4 RESÍDUOS AGROIUNDESTRIAIS.....	24
3.5 FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHÁ	24
3.6 TECNOLOGIA PRODUTIVA	25
3.7 CELULOSE BACTERIANA	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DAS CULTURAS DE KOMBUCHÁ	29
4.2 OBTENÇÃO E PREPARO DOS SUBSTRATOS.....	29
4.3 FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHÁ E OBTENÇÃO DA BIOMEMBRANA	29
4.4 PROCESSAMENTO DA BIOMEMBRANA DE CELULOSE.....	30
4.5 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	31
4.5.1 Medidas de pH	31
4.5.2 Medidas sólidos solúveis totais	31
4.5.3 Determinação de glicose e nitrogênio	31
4.6 CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA CELULOLÍTICA OBTIDA DA FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHÁ	31

4.6.1 Difração de Raios-X (DRX)	31
4.6.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) ...	32
4.6.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	32
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA.....	35
5.2 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO pH	37
5.3 SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS.....	38
5.4 GLICOSE E PROTEÍNA TOTAL	39
5.5 DIFRAÇÃO DE RAIO-X.....	41
5.6 FTIR	42
5.7 MEV	45
5.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	47
6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

A Kombuchá consiste numa associação simbiótica de bactérias e leveduras, acomodadas numa matriz de celulose sintetizada por bactérias acéticas (SANTOS, 2016). Essa cultura simbiótica é responsável pelo processo de fermentação. A sua origem ainda é incerta, mas acredita-se que tenha surgido na Manchúria, no nordeste da China, sendo conhecida como o chá da imortalidade (KAUFMANN, 2013). O preparo dessa bebida acontece por meio de uma infusão de folhas fresca, sendo o chá a base da fermentação. Suas características variam dependendo de diversos fatores, tais como a solução que será utilizada como substrato, os microrganismos presentes na cultura mãe e o tempo de fermentação (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016; JAYABALAN *et al.*, 2014).

Durante a fermentação, além do ácido acético, são produzidos diferentes compostos como etanol, ácido lático e glucurônico, isso se dá devido a presença de várias cepas de bactérias e leveduras. A bebida final também contém uma grande quantidade de polifenóis derivados do chá (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016; JAYABALAN *et al.*, 2007). É importante também citar que durante a fermentação as bactérias de ácido acético produzem um biofilme composto por fibrilas de celulose pura, que possui grande capacidade de retenção de água, alta cristalinidade e termo estabilidade (EMILJANOWICZ, 2019). A matriz de celulose bacteriana da kombuchá é rica em proteínas, fibra e aminoácidos essenciais e possui efeitos de inibição de crescimento de bactérias contaminantes.

Matriz de celulose fermentada por bacteriana tem se mostrado como um biopolímero com amplas possibilidades de aplicações, devido as suas características como a biodegradabilidade, pureza e biocompatibilidade que permitem sua aplicação em diversas áreas (KESHK, 2014). Os usos potenciais para uso da celulose bacteriana são nas áreas de cosmético, eletrônica, tratamento de efluentes, biomédica. Porém os altos custos de meio de cultivo e os baixos rendimentos obtidos durante o cultivo tornam esse tipo de produção em larga escala inviável. Alguns autores têm apostado em alternativas mais viáveis tanto economicamente quanto ambientalmente para a produção de celulose bacteriana com o uso de resíduos agroindustriais ou coprodutos como substrato para a fermentação, uma vez que estes contêm fontes de carbono e nitrogênio que podem ser utilizadas para produção de

celulose bacteriana (CARREIRA *et al.*, 2011; JOZALA *et al.*, 2014; LESTARI *et al.*, 2014)

Os consumidores desta bebida têm referido que esta alivia dores de cabeça, tem propriedades desintoxicantes, reduz o nível de colesterol, promove bom funcionamento do fígado, previne problemas digestivos e circulatórios, retarda o envelhecimento, melhora o metabolismo e visão, diminui a incidência de inflamações, entre outros efeitos (DUFRESNE, 2000; JAYABALAN *et al.*, 2014). Apesar de os estudos atuais não comprovarem totalmente os efeitos desta bebida no organismo humano, ela apresenta potencial como alimento com alegação funcional por ser um produto rico em termos nutricionais e deve ser consumido como parte de uma dieta saudável (SANTOS, 2016).

Por sua matriz de celulose bacteriana ser rica em proteínas, fibra e aminoácidos essenciais e possuir efeitos de inibição de crescimento de bactérias contaminantes, vê-se a possibilidade de oferecer a partir dessa matriz um produto benéfico à saúde humana. O interesse neste estudo é de colaborar com a área de biopolímero, advindo de uma base pouco conhecida, verificando as possibilidades de suas aplicações. Utilizando como base resíduos agroindustriais no desenvolvimento de meio de cultura que favoreçam o aumento da produção de celulose bacteriana, tendo como vantagem não só a redução nos custos de produção como também redução de impactos ambientais causadas pelo descarte destes resíduos no ambiente (CACICEDO *et al.*, 2016; FAN *et al.*, 2016).

Diante do apresentado, o objetivo geral do presente trabalho é avaliar a produção e caracterização da biomembrana de celulose microbiológica oriunda da fermentação da Kombuchá usando diferentes extratos de resíduos agroindústrias de abacaxi e maçã.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produção e caracterização de biomembrana de celulose microbiológica por fermentação de cultura estática pela simbiose de bactérias e leveduras encontrada na Kombuchá, através do uso de extratos de resíduos agroindústrias de abacaxi e maçã como fonte de carbono.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar a influência das concentrações dos resíduos agroindustriais na produção de massa da biomembrana em bebida tipo Kombuchá.
- Avaliar alteração de pH, sólidos solúveis totais (°Brix), peso úmido e peso seco durante o processo fermentativo.
- Avaliar as alterações de glicose e proteínas durante a fermentação.
- Caracterizar a estrutura da biomembrana celulolítica formada durante o processo de fermentação da bebida tipo Kombuchá obtidas nos diferentes meios de cultivo através das análises de FTIR, DRX e MEV.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CONCEITUAÇÃO E EVOLUÇÃO HISTÓRICA DA KOMBUCHÁ

A Kombuchá é uma bebida histórica caracterizada por ser refrescante, adocicada e levemente ácida. Sua obtenção se dá por meio da fermentação realizada a partir de chá adoçado que passa pela ação de um biofilme constituído através da associação simbiótica entre bactérias e leveduras, denominada tecnicamente de SCOBY (*symbiotic culture of bacteria and yeast*). A partir da fermentação é formada a bebida, essencialmente, por duas partes distintas: uma película celulósica e um caldo em forma líquida que é principalmente acidificado (BLAUTH, 2019).

Figura 1. Kombuchá: SCOBY imerso em chá verde.



Fonte: Autor (2022).

De acordo com a condução que é dada ao processo de fermentação, a Kombuchá pode ser, inclusive, caracterizada como bebida alcóolica, a depender das concentrações de etanol que lhe são características ao final da produção. Essa concentração vai variar de acordo com o tempo de fermentação e concentração de substrato utilizado. Tecnicamente, outros nomes podem ser atribuídos à bebida, tais como *Fungus japonicus*, *Olinca*, *Pichia fermentans*, *Combuchu*, dentre diversos outros (EL-SALAM, 2012).

De toda forma, é preciso salientar que se trata de uma bebida consumida em vários lugares do mundo, ainda que sua origem remonte ao nordeste da China, sendo,

nesta região, inicialmente valorizada por suas propriedades energizantes e desintoxicantes. Já em 414 a.C. foi apresentada ao povo japonês, por meio do médico coreano cujo nome era Kombu. A proposta da bebida era a de curar problemas digestivos enfrentados pelo então rei Ikyo. Dessa forma, foi a partir daí que a bebida passou a ser conhecida, inicialmente no Japão, como Kombuchá (BLAUTH, 2019).

A bebida foi introduzida na Europa no início do século XX, mas foi somente após a Segunda Guerra Mundial que o seu consumo verdadeiramente se popularizou. Em determinados países da Ásia, que acreditam serem berço de sua origem, ainda existem certas crenças associadas a esta bebida. Tanto que a Kombuchá, nesses locais, era constantemente preparada em casas religiosas (SANTOS, 2016).

No Brasil, especificamente, não existe qualquer registro que atestem informações sobre o seu consumo ou sua produção. Apesar disso, é certo que a produção e comercialização da Kombuchá é inegável, de maneira que no ano de 2019 foi editada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a Instrução Normativa n. 41 que estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) da Kombuchá (BLAUTH, 2019).

3.1.1 Legislação

A instrução Normativa N° 41/2019 do MAPA contém normas que estabelecem o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombuchá em território Nacional, sendo definida como “bebida fermentada obtida através da respiração aeróbica e fermentação anaeróbica do mosto obtido pela infusão ou extrato de *Camellia sinensis* e açúcares por cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas (SCOBY).”

Como ingredientes obrigatórios é descrito água potável, infusão ou extrato aquoso de *Camellia sinensis*, açúcares e o SCOBY da Kombuchá. Tendo como ingredientes opcionais: infusão de espécies vegetais em água, fruta, vegetal, especiarias, mel, melado e entre outros açúcares de origem vegetal, gás carbônico puro, fibras, vitaminas, sais minerais e outros. Também é autorizado o uso de aditivos aromatizantes e corantes naturais (BRASIL, 2019).

3.2 SCOBY PARA A PRODUÇÃO DA KOMBUCHÁ

O uso do SCOBY é voltado, principalmente, para a fermentação da Kombuchá, consistindo em uma matriz esponjosa celulósica que se constitui em forma de sino, identificado, também, como *tea fungus*. O seu crescimento acontece em condições adequadas tanto de pH quanto de temperatura. Além disso, uma de suas denominações mais comuns, atribuídas a esse tipo de biofilme e responsável pela cultura de espécies de bactérias acéticas e leveduras é nome que se atribui à própria bebida estudada, ou seja, Kombuchá (BLAUTH, 2019). Segundo Jayabalan et al. (2014) a temperatura ótima para fermentação ocorre entre 18 e 25°C.

O mencionado biofilme celulósico é adicionado ao chá ou mesmo ao substrato que sofrerá a fermentação, de maneira que passa a se chamar “cultura mãe”. Ao passo em que a fermentação evolui, uma camada nova de SCOBY é percebida na superfície do líquido que, por sua vez, poderá ser utilizada na inoculação de outro substrato (SANTOS, 2016).

A microbiota para a Kombuchá pode ser fracionada em duas partes distintas: a que está presente no biofilme celulósico e a que se encontra nos microrganismos localizados na porção líquida da bebida. Apesar da microbiota relacionada com o processo de fermentação da Kombuchá ser diferente conforme a localização geográfica em que se encontra, é possível destacar as suas principais famílias, espécies e gêneros de leveduras e de bactérias que estão presentes em todas as porções da Kombuchá (EL-SALAM, 2012).

Sendo assim, vale ressaltar que os procaríotos mais frequentes no SCOBY são as bactérias pertencentes ao gênero *Gluconobacter* e *Acetobacter*, de maneira que a principal bactéria capaz de criar a rede celulósica flutuante na superfície da bebida é a *Acetobacter xylinum*. A descrita rede compreende um metabólito secundário da fermentação da Kombuchá que serve, principalmente, para estruturar fisicamente o desenvolvimento simbiótico, sendo essa rede celulósica uma das mais relevantes características dessa cultura (OLIVEIRA et al., 2007).

Além das próprias bactérias acéticas, são identificadas diversas outras espécies de leveduras na Kombuchá. Chakravorty et al. (2016) estudaram precisamente a cinética microbiológica dessa bebida e identificaram que o gênero *Candida* foi a espécie de levedura mais frequente nas porções de biofilme e líquido.

Já Marsh et al. (2014) constataram a predominância incontestável de *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* nas amostras selecionadas no seu estudo.

3.3 PRODUÇÃO DA KOMBUCHÁ: CONSTITUIÇÃO E INGREDIENTES

A IN N°41/2019 anteriormente mencionada especifica quais são os ingredientes básicos e obrigatórios que fazem parte da constituição da bebida, são eles: água potável, extrato aquoso ou infusão de *Camellia sinensis*, açúcares, leveduras e cultura de bactérias próprias para viabilizar a fermentação alcóolica e acética, considerando sempre os cuidados necessários à preservação da saúde humana (BLAUTH, 2019).

Além dos mencionados ingredientes, é possível utilizar na fabricação da bebida a infusão de determinadas espécies vegetais em água ou mesmo os seus respectivos extratos, mel, frutas, vegetais, especiarias, outros tipos de açúcares de origem vegetal e até mesmo o gás carbônico industrialmente puro. Ademais, de acordo com a legislação vigente, é possível que sejam adicionadas vitaminas, fibras, sais minerais e outros aditivos em Kombuchá não alcóolica (EL-SALAM, 2012).

É importante ressaltar que, para que aconteça o processo fermentativo e, conseqüentemente, a produção de Kombuchá, é fundamental suprir as necessidades nutricionais dos microrganismos que estão presentes no SCOBY. Muito embora sejam diversificados, tais microrganismos usam nutrientes relativamente simples em suas vias metabólicas, a exemplo da água, carbono e alguns elementos minerais específicos (BLAUTH, 2019).

3.3.1 Chás e infusões variadas

O chá ou qualquer outro tipo de infusão, desempenha uma função muito importante em todo o processo produtivo da Kombuchá, visto que disponibiliza muitos dos componentes necessários ao crescimento dos microrganismos. Além disso, exerce considerável influência na obtenção de características sensoriais do produto, logo depois de sua fermentação (EL-SALAM, 2012).

A cafeína e a teofilina, por exemplo, que se apresentam como elementos do grupo das purinas e que estão presentes nos chás são essenciais para que os microrganismos sejam capazes de produzir ácidos nucleicos, servindo, ainda, como

fonte principal de nitrogênio. O uso do chá verde está se tornando cada vez mais popular entre aqueles que produzem a Kombuchá em razão dos diversos benefícios associados aos polifenóis que estão presentes nele (BLAUTH, 2019).

Nesse sentido, é válido destacar que os chás são infusões obtidas por meio da escalda de folhas e, no decorrer do seu processamento, diversas alterações químicas acontecem. Para a fabricação da Kombuchá, por muito tempo, foram utilizados, prioritariamente, o chá preto e o chá verde, como já mencionado anteriormente. No chá preto, por exemplo, as alterações químicas responsáveis por seu escurecimento são as de oxidação enzimática, de maneira que esse chá é conhecido, principalmente, por suas propriedades estimulantes e desintoxicantes (DUFRESNE & FARNWORTH, 2000).

Já o chá verde apresenta diferenças químicas e tecnológicas quando comparado ao chá preto. Isso, porque a atividade enzimática que acontece nesse tipo de chá é inibida por meio de um tratamento térmico e, assim, não existe a etapa da oxidação como acontece no chá preto. Sendo assim, as características do chá verde são definidas, principalmente, pela composição básica das folhas ainda no momento da sua coleta (BLAUTH, 2019).

Atualmente, a fabricação da Kombuchá não se limita apenas a esses tipos de chás. Compreende-se que, qualquer extrato de planta comestível associado à quantidade correta de açúcar pode servir de base para o preparo dessa bebida, sendo que a única restrição é que nenhum dos componentes utilizados iniba o crescimento do SCOBY.

3.3.2 Açúcares

Quando se trata de microrganismos relacionados na produção de Kombuchá, a sua fonte de energia é a fonte de carbono, sendo a sacarose a mais utilizada, uma vez que eles são quimiorganotróficos. Esse tipo de fonte é essencial para proporcionar a biossíntese de vários constituintes celulares desses microrganismos, de forma que os caminhos metabólicos deles são utilizados com o objetivo de transformar compostos como carboidratos, lipídeos e ácidos nucléicos em compostos metabólicos que possam, efetivamente, ser metabolizados por vias centrais (RIGO, 2006).

Nesse sentido, as leveduras e as bactérias existentes no SCOBY estão envolvidas no processo metabólico que acontece impulsionado por meio da sacarose.

As leveduras, por sua vez, possuem a função de fermentar a Kombuchá, ao passo em que se responsabilizam por hidrolisar a sacarose, convertendo-a em açúcares mais simples tais com a glicose e a frutose. Esses açúcares são convertidos em etanol por meio de glicólise e, conseqüentemente, produzem gás carbônico. Assim, as bactérias acéticas fazem uso da glicose para produzir o ácido glucónico, utilizam, ainda, a glicose e a frutose visando produzir celulose e, por fim, o etanol para que seja possível produzir o ácido acético.

3.3.3 Substratos alternativos

Além dos ingredientes mencionados, alguns substratos alternativos estão sendo utilizados para possibilitar a fermentação da Kombuchá. Essa utilização tem como objetivo principal criar um produto, potencializar as suas propriedades, principalmente aquelas que se destacam como antioxidantes e sensoriais. De acordo com os estudos de Vitas et al. (2013), já se tem registro de uso de substratos, compreendidos como não convencionais, tais como sucos de frutas, leite, vinho e cerveja. Alguns deles serão analisados nessa oportunidade.

O primeiro substrato alternativo a ser analisado é o suco de uva vermelha, já utilizado por Ayed, Abid e Hamdi (2016) em sua pesquisa. Os autores fizeram a pesquisa buscando avaliar o potencial de tal alternativa, de maneira que essa avaliação aconteceu para as bebidas sob fermentação entre 6 e 12 dias e considerando os quesitos como intensidade, doçura, aroma, acidez, aceitabilidade e cor. Por meio das avaliações, observou-se que o suco em processo de fermentação por 12 dias teve uma aceitação inferior no que diz respeito ao conjunto de atributos considerados. Sendo assim, perceberam que 6 dias é o suficiente para a obtenção de uma bebida sensorialmente satisfatória.

Zubaidah et al. (2019) fizeram uso de suco da fruta relacionados à espécie de palma *Salak* para o preparo de Kombuchás. Com esse experimento, os autores perceberam que a bebida produzida apresentava um considerável potencial para possuir propriedades funcionais, visto que elevou significativamente as atividades antioxidantes e antibacterianas do suco natural quando ainda não fermentado.

3.4 RESÍDUOS AGROIUNDESTRIAIS

Devido a grande preocupação com a contaminação ambiental pelo descarte incorreto de subprodutos agroindustriais e, com o acentuado desperdício de alimentos desprezados pela indústria de alimentos e pela população, a utilização de subprodutos vegetais vem recebendo atenção especial dos pesquisadores, devido às suas valiosas propriedades nutricionais (TEIXEIRA, 2013).

Estima-se que a produção mundial de resíduos agroindustriais atinja 1,3 bilhão de toneladas por ano, sendo 1/3 desse total desperdiçados como resíduos (FAO, 2013). O agronegócio no Brasil é bastante produtivo e promissor, influenciando dessa forma na grande produção de resíduos (MAPA, 2018).

O aproveitamento desses resíduos é uma forma de diminuir os impactos ambientais causados pelo descarte feito de forma incorreta no meio ambiente. O bioprocessamento é uma maneira de aproveitar esses resíduos para a produção de produtos com possível valor agregado (MARZO et al., 2019).

Atualmente, diversos processos já tem sido desenvolvidos com a utilização desses resíduos. Apesar da grande diversidade metabólica, estes resíduos não são sempre de fácil utilização e requer diversos estudos para otimizar suas melhores condições de uso antes da aplicação final (SINGH, 2009).

Dessa forma, a produção de bioprodutos oferece uma alternativa para a agroindústria (SCHALCHLI et al., 2016), atendendo ao apelo a problemas ambientais e sustentáveis, onde cada vez mais o consumidor tem preferência por produtos naturais, biodegradáveis e amigo do ambiente (DIAZ; BLANDINO; CARO, 2018).

3.5 FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHÁ

A fermentação da Kombuchá acontece de maneira espontânea e rápida, em razão do biofilme celulósico que é enriquecido com diversas espécies de bactérias e leveduras. Já se sabe que as comunidades de bactérias e leveduras características da bebida atuam em uma relação simbiótica durante o procedimento de fermentação. O biofilme presente realiza o processo de fermentação da bebida e faz com que ele seja extremamente similar ao processo do vinagre, de modo que cada fermentação dá origem a uma nova camada de biofilme, capaz de ser utilizada em futuras fermentações (BLAUTH, 2019).

As fermentações espontâneas, de maneira geral, são compreendidas como mais difíceis de se controlar quando comparadas às fermentações induzidas, visto que no primeiro processo não se conhece a microbiota por completo, o que impacta nas condições para proporcionar o ambiente de fermentação adequado (EL-SALAM, 2012).

3.6 TECNOLOGIA PRODUTIVA

De modo tradicional, a Kombuchá é produzida posicionando o SCOBY em um caldo específico de chá levemente açucarado para que seja possível o processo de fermentação. O quantitativo de chá, açúcar e SCOBY podem sofrer variações de acordo com o volume de água a ser utilizado (m/V). Seguindo essa lógica, tem-se que: 0,5% de folhas de chá para posterior infusão; 5% (m/v) para sacarose; 24% (m/v) do SCOBY e um total de 20% (v/v) de caldo de Kombuchá após fermentação (SHADE, 2011).

Passado o resfriamento da infusão açucarada, considerando uma temperatura que varia, impreterivelmente, entre 20° e 22°C, adiciona-se o SCOBY dentro de um recipiente que deve ter sido anteriormente e devidamente esterilizado. Após a adição da Kombuchá fermentada, se perceberá a diminuição do pH, chegando a uma média de 5, de maneira que o crescimento de microrganismos não desejados seja completamente inibido (BLAUTH, 2019).

Com isso, o recipiente em que foi adicionado a bebida deve ser integralmente coberto por meio de um anteparo que seja permeável a gases e que, ao mesmo tempo, evite a entrada de insetos e impurezas. Além disso, deve-se considerar que a temperatura mais propícia para a realização do processo de fermentação é uma variável entre 18° e 26°C (SHADE, 2011).

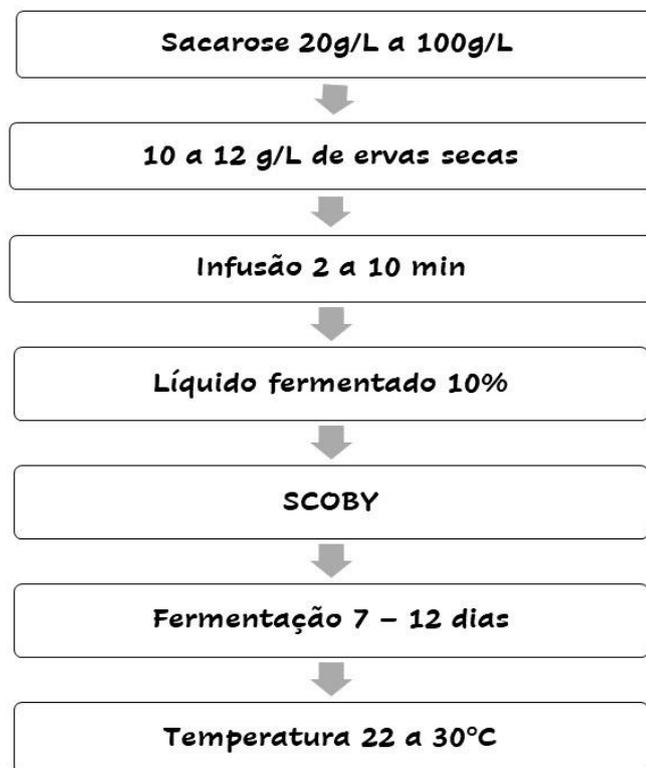
Logo depois dos primeiros dias de fermentação, uma fina colônia de bactérias e leveduras será formada e se acumulará na superfície do líquido. No decorrer dessa fase, o chá passará a exalar um odor característica da fermentação e, ao mesmo tempo, será possível visualizar bolhas de gás decorrentes da produção de gás carbônico.

A cultura mãe continua com o seu volume inicial, sempre abaixo da nova cultura que se formou e, por causa disso, se posiciona na base do recipiente, afundando no líquido fermentado. Após alguns dias, é possível notar a formação de uma nova

cultura. Assim, as culturas são removidas, o líquido que sobrar deve ser filtrado e disposto em garrafas que precisam ser tampadas e armazenadas de forma refrigerada (BLAETH, 2019).

É importante afirmar, ainda, que o tempo de fermentação destinado à Kombuchá é essencial para a definição do seu sabor, sendo esse processo separado um tempo que varia entre 2 e 14 dias. A concentração e composição de açúcar, de chá e da própria procedência do SCOBY se modifica conforme as preferências daqueles que consomem e/ou produzem a bebida (EL-SALAM, 2012).

Figura 2. Fluxograma do processo produtivo da Kombuchá.



Fonte: Autor (2022).

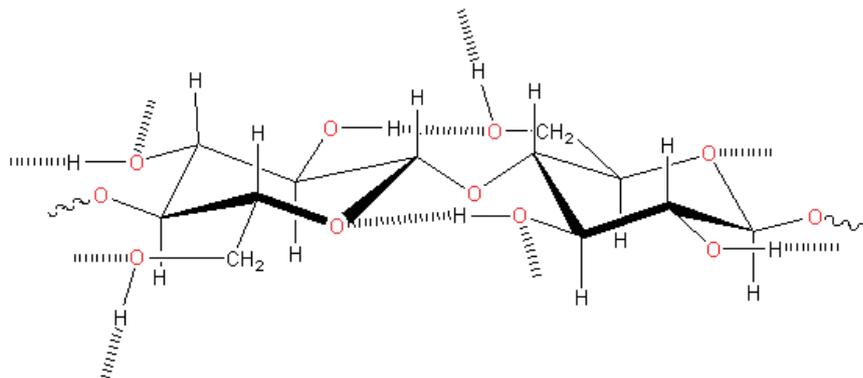
3.7 CELULOSE BACTERIANA

A celulose bacteriana é um polímero natural que apresenta características especiais: estrutura nanométrica, alto índice de cristalinidade, alta capacidade de absorção de água, pureza e biocompatibilidade. As bactérias do gênero *Gluconacetobacter* são as principais responsáveis pela síntese de celulose bacteriana

(DONINI *et al.*, 2010). São bactérias Gram-negativo, não patogênico, pode ser encontrada na natureza em vegetais, frutas e produtos fermentados (De Amorim *et al.*, 2019). O polissacarídeo formado pela CB é excretado pelas células, por ser sintetizada através de organismos vivos é considerada um biopolímero (Sriplai & Pinitsoontom, 2020).

A celulose vegetal comumente usada é impura, pois, apresenta grande quantidade de lignina ou hemicelulose o que confere a ela resistência às reações químicas. A celulose bacteriana possui a mesma fórmula molecular da celulose vegetal ($C_6H_{10}O_5$)_n, mas seus aspectos físicos e químicos são diferentes (REZAEI *et al.*, 2008), possui diversas vantagens como alta pureza, melhor resistência mecânica, cristalinidade e hidrofiliabilidade (PHISALAPHONG, 2008).

Figura 3: Estrutura linear da celulose



Fonte: Donini *et al.*, (2010).

A estrutura química da celulose bacteriana é constituída por unidade de β -D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas β -(1-4). A presença de hidroxilas facilita ligações com diferentes grupos funcionais (COIMBRA, 2016).

Figura 4. Celulose bacteriana da Kombuchá em chá



Fonte: Autor (2022).

A celulose bacteriana, tem sido amplamente investigada como um novo tipo de material de suporte devido à sua organização estrutural, complexo reticular de fibra fina, biocompatibilidade, alta capacidade de retenção de água, e alta resistência à tração. Tais propriedades tornam a celulose bacteriana um material com potencial para várias aplicações (PUTRA, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DAS CULTURAS DE KOMBUCHÁ

A cultura de Kombuchá provém de um preparo doméstico na região de Recife, Pernambuco. A Kombuchá caseira consiste em películas frescas imersas em chá verde e Kombuchá previamente fermentada, armazenadas sob refrigeração.

Para reativação do SCOOPY as culturas da Kombuchá foram preparadas em 7g/L de extrato seco de chá verde posteriormente incubadas em repouso a temperatura de $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas, estando aptas para utilização no experimento descrito.

4.2 OBTENÇÃO E PREPARO DOS SUBTRATOS

Os resíduos de abacaxi e maçã foram cedidos por empresas fornecedoras de hortifruti. Os resíduos foram coletados no próprio local de distribuição e, imediatamente transportado para o laboratório de Técnica Dietética – UFPE/CAV, onde ficaram armazenadas sob congelamento (-18°C) até processamento e utilização. Para produção dos meios os resíduos foram descongelados e processados em liquidificador com água filtrada em quantidade que variaram de 10%, 20% e 30% de insumo e posteriormente peneirado para obtenção apenas do líquido, sendo posteriormente colocado em vapor fluente por 15 min em autoclave, para utilização como meio de cultura estéril e resfriado à temperatura ambiente antes da inoculação.

4.3 FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHÁ E OBTENÇÃO DA BIOMEMBRANA

Os meios de cultura alternativos para a realização do processo fermentativo da bebida tipo Kombuchá foram compostos por extratos de resíduos de abacaxi e maçã nas proporções de 10%, 20% e 30% de resíduos. As soluções com meio de cultura foram divididas em porções de 300 ml em recipientes de vidros estéreis e procedido da inoculação da cultura de Kombuchá com 10% (v/v) de chá previamente fermentado com a proporção de 100g/L de sacarose. Para ensaio controle foi realizada a produção da Kombuchá em chá verde. Procedeu a verificação da produção da biomembrana em diferentes intervalos de tempo (7, 14 e 21 dias). Em cada período de cultivo, a

4.5 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

4.5.1 Medidas de pH

Os valores de pH foram medidos utilizando um pHmetro de bancada PHTEK modelo PHS-3B. Para realizar a medição, o equipamento foi calibrado com soluções de pH de acordo com as instruções do fabricante. O equipamento foi limpo com água destilada entre a troca de cada amostra que era lida. Foi determinado o pH inicial de todos os meios e medidos periodicamente nos tempos de 7, 14 e 21 dias.

4.5.2 Medidas sólidos solúveis totais

Os valores de Brix foram obtidos através de um refratômetro de bancada do tipo ABBE, para determinação do índice de refração. As amostras fermentadas foram colocadas em gotas sobre o cristal do refratômetro, após calibração com água destilada. Os resultados obtidos representam o índice de sólidos solúveis totais na amostra, onde 1°Brix representa 1 grama de açúcar por 100 gramas de solução.

4.5.3 Determinação de glicose e nitrogênio

A determinação dos valores de glicose foi realizada pelo método colorimétrico enzimático (Kit InVitro® – Glicose oxidase). Para determinar as concentrações de glicose das substâncias testes, foi elaborada anteriormente uma curva padrão usando uma gama de soluções de glicose (10 e 100 mg/dL). Para determinação dos valores de nitrogênio foi utilizado o método colorimétrico Kit InVitro® para proteínas. Para obtenção dos resultados foi utilizado um leitor de microplacas modelo TP-Reader NM, foi realizada a leitura da D.O 492nm para glicose e 550nm para proteínas.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA CELULOLÍTICA OBTIDA DA FERMENTAÇÃO DA KOMBUCHÁ

4.6.1 Difração de Raios-X (DRX)

A análise de difração de Raios-X foi realizada no Labtag do Departamento de Engenharia Civil da UFPE. Em um equipamento da marca Bruker, modelo D2

PHASER. Os parâmetros para a análise foram de radiação CuK α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) com tensão de 40 kV e corrente de 30 mA, varredura angular de 5° a 70° (ângulo de Bragg - 2θ), velocidade varredura 1,2° por min e passo angular de 0,02 por segundo. Os dados gerados, foram exportados para planilhas do Excel e os gráficos gerados no software Origin®.

Índice de cristalinidade (IC) foi estimado pelo método descrito por Seagal et al. (1959) segundo a equação:

$$IC (\%) = [(I_{002} - I_{am}) / I_{002}] \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

Onde I_{002} é a intensidade máxima do pico de difração para a região cristalina referente ao plano cristalográfico 002 e I_{am} é a intensidade da parte amorfa da amostra.

4.6.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram realizados para caracterizar as estruturas químicas presente nas membranas de celulose obtidas a partir dos diferentes meios de cultura, através de um equipamento de espectrômetro IR PRESTIGE – 21 acoplado com suporte ATR – 8200HA (Shumadzu, Tóquio, Japão). A amostra foi depositada na célula do cristal (ZnSe e Ge) à temperatura ambiente, com faixa de varredura no intervalo de 4000 - 700 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} e número de acumulação de 30 scans. Os dados gerados foram tratados no software Origin®.

4.6.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras de celulose bacteriana (CB) secas em estufa a 28°C durante 48h, foram montadas em “stubs” metalizadas com uma fina camada de ouro por eletrodeposição para tornarem-se eletricamente condutoras. A MEV foi utilizada para caracterização morfológica da superfície das membranas de CB. A análise de microscopia eletrônica de varredura foi realizada no equipamento de marca TESCAN, modelo Mira 3, localizado na Central analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, sob tensão de aceleração eletrônica de 10kv. As imagens

foram adquiridas no modo elétrons secundários com magnificações de 400 a 20 000 mil vezes.

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os microrganismos patogênicos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9028, *Candida albicans* URM 5901, *Candida kruzei* URM 6391 foram cedidas pela coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE, Departamento de Micologia da UFPE, e Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL), pertencente ao departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE.

Os microrganismos foram cultivados em caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas por 18 horas (cepas bacterianas) e 24 horas (cepas de *Candida*), incubadas a 37°C. Após o período de incubação, 100 µL de cada linhagem de microrganismos foram adicionadas a solução salina 0,9% estéril, até se obter a concentração dos pré-inóculos padronizados de acordo com a escala de McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

A solução de celulose da kombucha foi preparada para obtenção de uma concentração inicial de 20mg/mL. Para isso, 8g de celulose da Kombuchá foi homogeneizada em 400mL de água ultrapura em Liquidificador ultra turbo mallory 900W 220V, durante 10 minutos. A solução obtida foi filtrada em membrana millipore de 0,45µm. A solução foi armazenada em frasco de vidro com tampa em rosca esterilizado até a utilização para os testes de atividade antimicrobiana.

A ação antimicrobiana foi avaliada pela técnica de microdiluição para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizando como revelador de viabilidade a resazurina, assim como para determinação do índice de inibição da viabilidade celular pela técnica de microdiluição, por leitura da densidade ótica (D.O) a 550nm.

Tanto a determinação da CIM, quanto do Índice de inibição da viabilidade celular foram realizados em microplacas de 96 poços de fundo chato em caldo BHI. A concentração final da solução de celulose nos poços variou de 0,0 a 12 mg/mL. Cada poço recebeu 20µl do inóculo, o meio de cultura e as soluções testes, completando um volume final de 100µl. Conforme apresentado na tabela 1. A concentração de

nutrientes do meio caldo BHI foi ajustado para todas as concentrações de celulose, no intuito de garantir a mesma disponibilidade de nutrientes em todos os poços. A fim de garantir o controle de esterilidade do meio e da celulose, e a viabilidade dos microrganismos, a linha H foi preenchida com meio de cultura, meio de cultura e inóculo microbiano e meio de cultura e celulose. Em seguida, o sistema foi agitado suavemente, e incubado por 24 horas a 37 °C.

Após o período de incubação, para determinação da CIM foram adicionados 30 µL de resazurina, preparada em solução aquosa (0,01%), em todos os poços e reincubadas a 37 °C por 60 minutos. O crescimento foi observado pela mudança de cor de roxo escuro (células inviáveis) para rosa (células viáveis). Onde, a CIM foi verificada na concentração mais baixa onde ocorreu a inibição do crescimento microbiano. O teste foi realizado em duplicata.

Para determinação do índice de inibição da viabilidade microbiana foi realizada leitura da D.O a 550nm das microplacas no tempo zero (assim que o sistema foi preparado havendo distribuição da solução de celulose, meio caldo BHI e microrganismos), e no tempo final após as 24h de incubação a 37°C. Como branco foi preparada uma microplaca contendo meio de cultura com a solução de celulose variando nas mesmas concentrações testadas. O inóculo meio de cultura e microrganismo foi considerado como crescimento 100%. Dessa forma, o índice de inibição do crescimento microbiano (IICM) foi calculado pela equação 2:

$$\text{Eq. IICM} = 100 - (D.O_{\text{final}} - D.O_{\text{inicial}})$$

Tabela 1: Ensaio da atividade antimicrobiana realizada em placa de 96 poços.

Linhas	ST (µl)	Meio (µl)	Inoculo (µl)
A	60	20	
B	50	30	
C	40	40	
D	30	50	
E	20	60	20
F	15	65	
G	10	70	
H		BRANCO	

ST – Substância teste (Celulose de Kombuchá) Fonte: Autor (2022).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA

A produção de celulose bacteriana produzida pela Kombuchá em meios de cultivo alternativos foi investigada para analisar a evolução durante o processo fermentativo, utilizando chá verde na proporção de 7g/L como meio controle em comparação com os meios com base nos resíduos de abacaxi e maçã que variaram nas proporções de 10%, 20% e 30%, adicionado 100g/L de sacarose e 10% (v/v) do chá previamente fermentado. Durante a fermentação nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias, foram avaliados o pH, sólidos solúveis totais, glicose, nitrogênio (proteínas totais) e peso seco. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados calculados em média e desvio padrão.

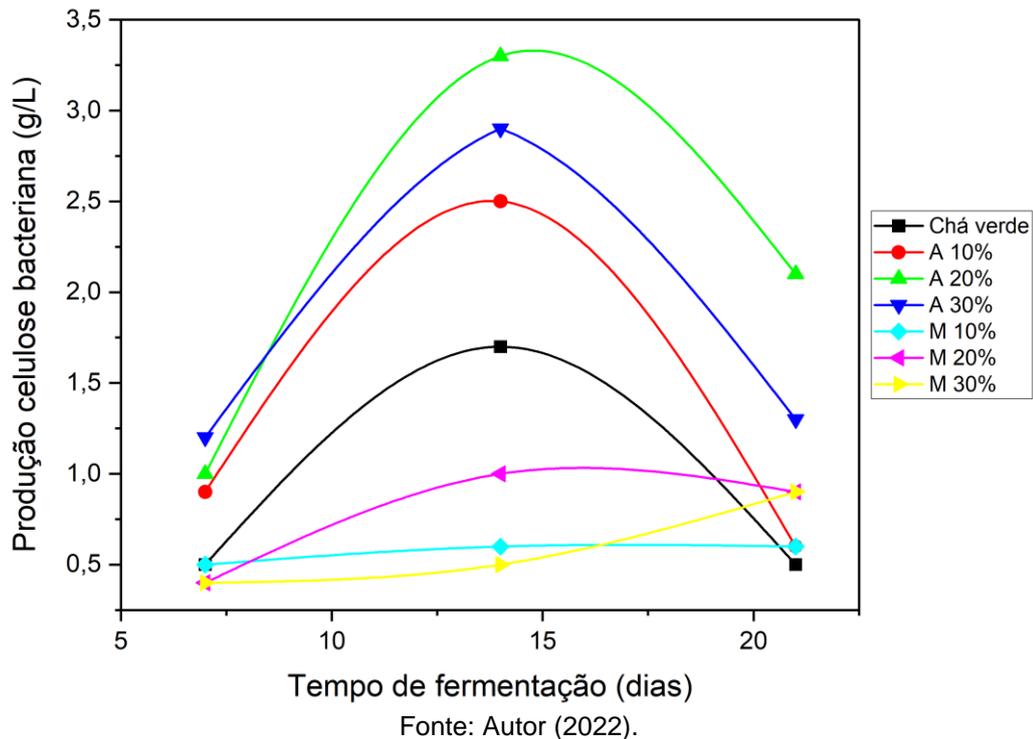
Os dados expressos na tabela 2 e na figura 5 são a média e desvio padrão do peso seco das celulosas produzidas no meio controle de chá verde e nos meios alternativos em diferentes concentrações de abacaxi e maçã, após 21 dias de cultivo. É possível observar que os valores de produção da celulose aumentaram, de uma maneira geral, durante o tempo de fermentação. O chá verde e a maçã apresentaram uma progressão de produção menor, enquanto no abacaxi 20% observaram-se uma maior produção em 14 dias de fermentação.

Tabela 2: Dados do peso seco realizados durante os 21 dias de fermentação em meios de cultivos alternativos.

Substrato	7 dias		14 dias		21 dias	
	Úmida (g/L)	Seca (g/L)	Úmida (g/L)	Seca (g/L)	Úmida (g/L)	Seca (g/L)
CHÁ VERDE	27,70	0,50 ± 0,1	32,40	1,70 ± 0,4	183,50	0,50 ± 0,1
A 10%	17,50	0,90 ± 0,1	18,20	2,50 ± 0,4	153,60	0,60 ± 0,0
A 20%	23,00	1,00 ± 0,3	19,60	3,30 ± 0,4	17,10	2,10 ± 0,1
A 30%	20,90	1,20 ± 0,3	14,70	2,90 ± 0,1	157,00	1,30 ± 0,1
M 10%	35,60	0,50 ± 0,1	10,30	0,60 ± 0,0	167,00	0,60 ± 0,1
M 20%	28,60	0,40 ± 0,0	12,60	1,00 ± 0,0	170,50	0,90 ± 0,1
M 30%	24,20	0,40 ± 0,0	13,70	0,50 ± 0,1	170,90	0,90 ± 0,1

Fonte: Autor (2022).

Figura 6: Produção de celulose bacteriana em diferentes meios de cultivo durante 21 dias de fermentação, após secagem.



Na figura 5 pode-se observar melhor a produção de celulose obtidas nos intervalos de tempo 7, 14 e 21 dias, verificando que o meio produzido com abacaxi 20% houve uma maior produção em 14 dias. A celulose da maçã nos primeiros 7 dias de fermentação se apresentou quebradiça, não sendo possível retirá-la para pesagem sem ocorrer perda de massa no meio de cultivo. A produção de CB em A20% apresentou uma produção de 3,30 g/L em 14 dias de fermentação, representando a melhor produção do ensaio.

Vale ressaltar que a celulose bacteriana possui uma elevada capacidade de absorção e de retenção de água, podendo apresentar um volume de aproximadamente 98 % de água (PECORATO et al., 2008). Com a secagem das membranas foi avaliado o percentual de retenção de água durante o processo fermentativo, obtendo uma média entre 90 – 98%, sendo o tempo de 14 dias o que obteve menor percentual de retenção de água, sugerindo que a exposição da membrana no meio durante um longo período tem uma maior retenção de água pelos poros quando ao nível que a produção de celulose diminui.

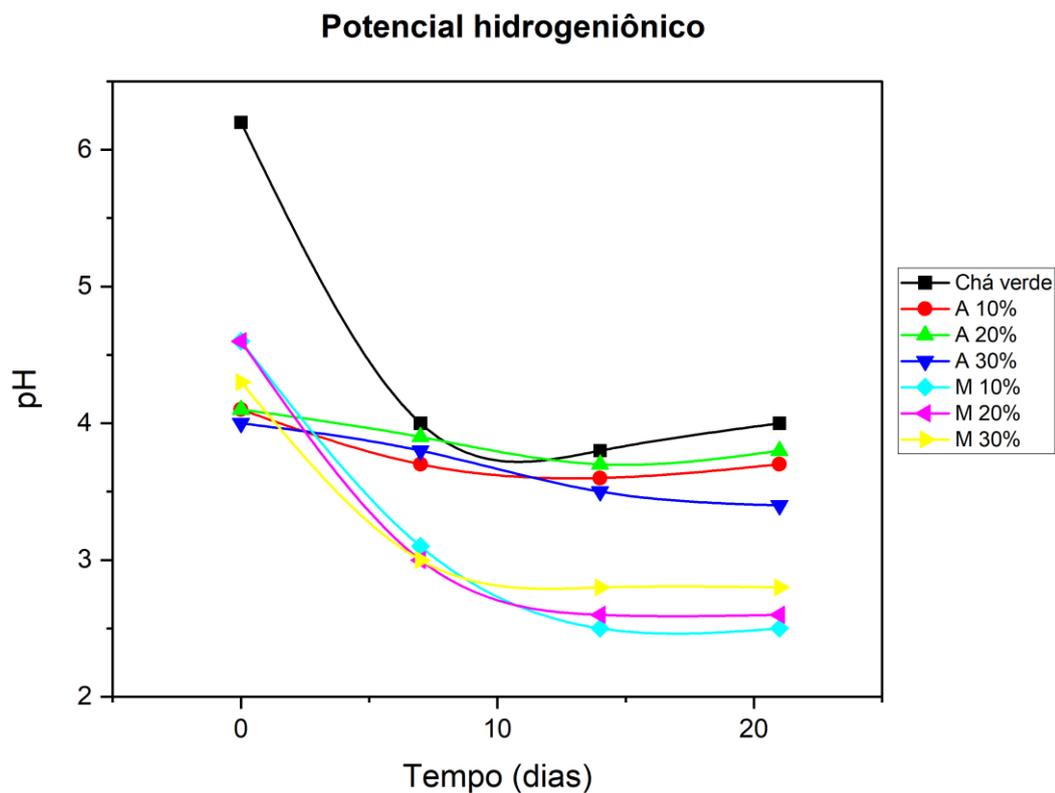
O resultado de 3,30 g/L de massa seca obtido através da fermentação de 14 dias em resíduo de abacaxi à 20% foram próximo ao relatado por Lima et al. (2017)

que obteve 3,38 g/L de massa seca em 10 dia de fermentação de *Komagataeibacter hansenii* em suco de sisal. Schroeder (2019) obteve 0,82 g de CB seca em substrato de acerola à 10% em 21 dias de fermentação com Kombuchá.

5.2 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO pH

Uma das condições que influencia na produção de celulose é o pH do meio de cultura. De acordo com Lee (2014), a produção do biopolímero de celulose bacteriana ocorre entre 4,5 – 7,5, onde um maior rendimento é observado em um pH 6,5. Durante o processo fermentativo as bactérias presentes metabolizam os açúcares e os compostos nitrogenados produzindo metabólitos secundários como ácido acético, ácido láctico e ácido glucônico, alterando dessa forma o pH do meio.

Figura 7: Comportamento do pH nos meios de cultivos avaliados.



Fonte: Autor (2022).

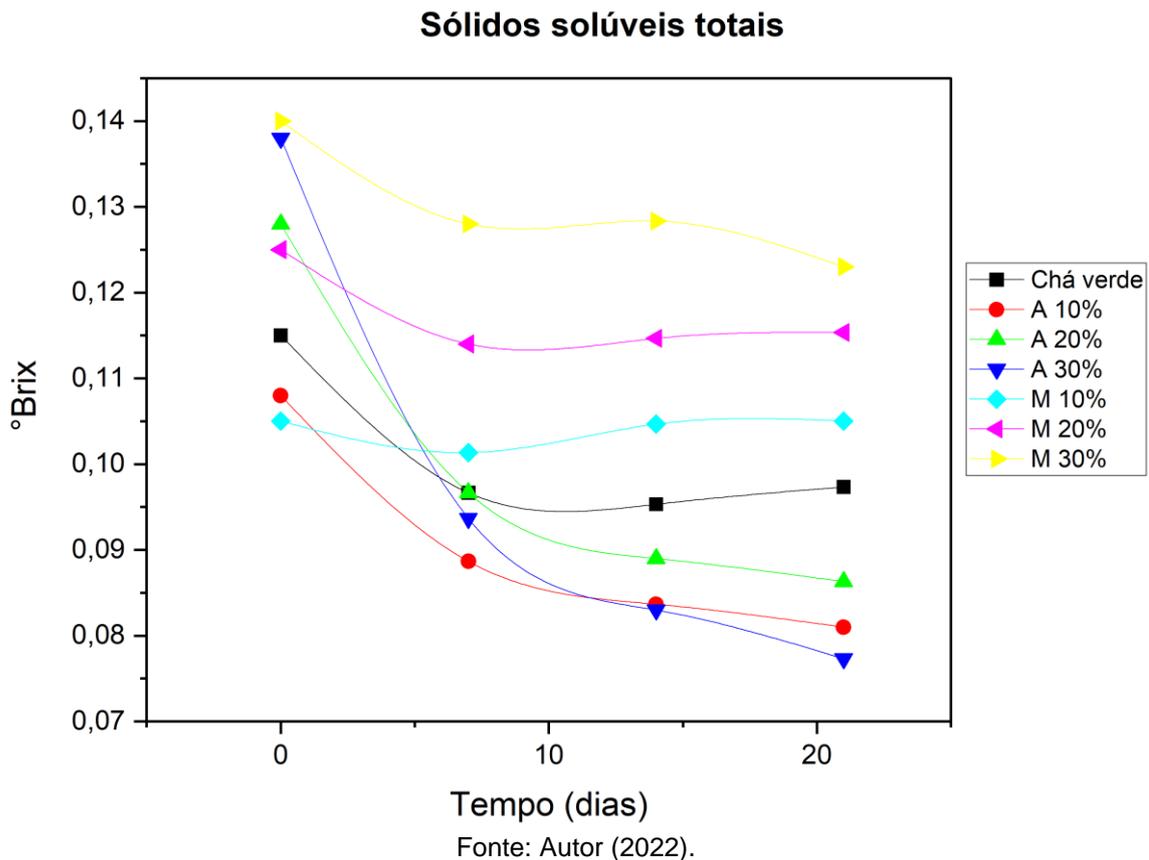
Conforme mostra a figura 6, houve uma diminuição do pH durante o processo fermentativo nos diversos meios utilizados, corroborando que ácidos orgânicos foram sintetizados. Alguns autores relatam a redução significativas de pH no processo de

fermentação tradicional da Kombuchá, Filippis *et al.* (2018) obteve uma redução de 3,95 para 2,9 em 12 dias de fermentação. Segundo Sharma e Bhardwaj (2019) maiores concentrações de açúcar não levam ao aumento de massa celulósica.

5.3 SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS

O índice de refração que mede a concentração de sólidos solúveis totais foi determinado nos meios de cultivos durante todo o processo de fermentação nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias. Na figura 7 se verifica o consumo de sólidos solúveis totais durante o processo fermentativo, onde a redução mais expressiva foi das amostras A20% e A30%, sendo as mesmas amostras com a melhor produção de massa celulósica.

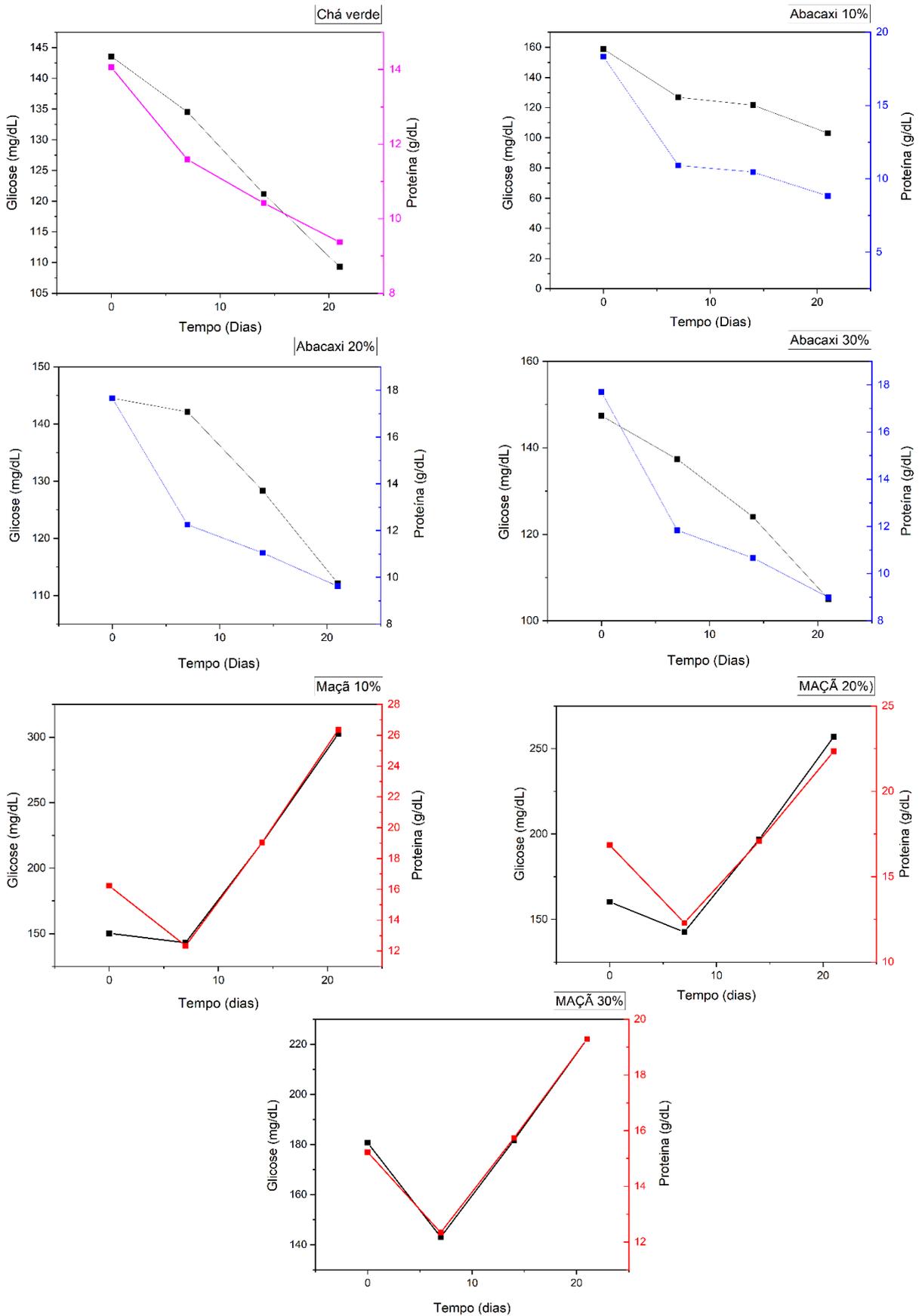
Figura 8: Índice de refração dos meios alternativos durante o processo fermentativo da Kombuchá.



5.4 GLICOSE E PROTEÍNA TOTAL

A figura 8 mostra o comportamento do nível de glicose e proteínas nos meios propostos durante o processo de fermentação no tempo de 21 dias. A produção de CB ocorre durante o consumo de glicose e proteína, confirmando o consumo das fontes de carbonos e de nitrogênio presente nos substratos. No meio contendo maçã pode-se observar um aumento no teor de glicose e proteína após 7 dias de fermentação. Como a maçã possui um pH mais ácido que o abacaxi, isso sugere a presença da bactéria *Leuconostc mesenteroides*, do grupo das bactérias lácticas muito comumente encontra em frutas. Com a redução do pH durante a fermentação o meio torna suscetível ao desenvolvimento da *L. mesenteroide* responsável por produzir exopolossacarídeos (EPS) como a dextrana, deixando o meio mais doce e mais viscoso, além de formar outros produtos como compostos nitrogenados aumentando também a concentração de nitrogênio no meio.

Figura 9: Quantificação de glicose e proteína durante o processo fermentativo da Kombuchá.

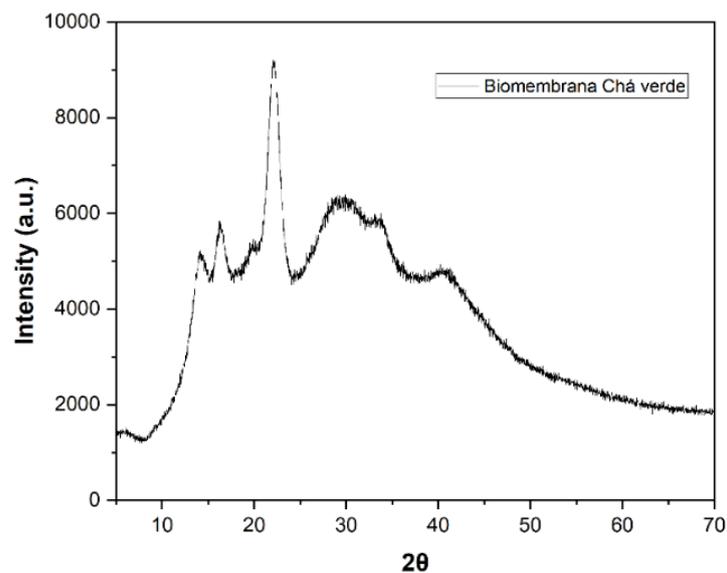


Fonte: Autor (2022).

5.5 DIFRAÇÃO DE RAIO-X

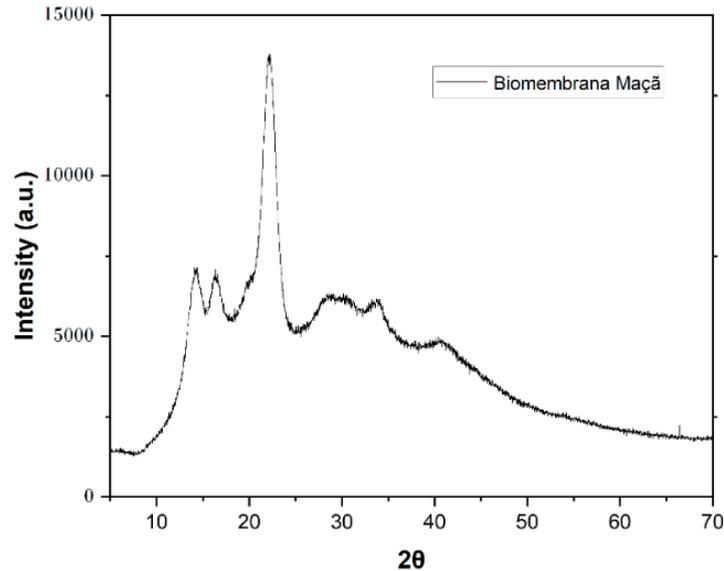
O espectro da difração de Raio-X da biomembrana obtida nos diferentes meios de cultivo (ângulo 2θ variando 5° à 70°) foi realizado para verificar se os componentes dos meios de cultivo interferem na cristalinidade da celulose. As figuras 9 e 10 mostram o espectro da difração de Raio-X da biomembrana de celulose de acordo com os meios de cultivo. O índice de cristalinidade (IC) foi calculado com base na intensidade dos picos obtidos através do DRX. Em cada uma das figuras seguintes podemos observar três picos característicos da celulose I, geralmente obtida em meio HS padrão.

Figura 10. Espectro da difração de Raio-X da Biomembrana obtida em meio de chá verde (concentração de açúcar: 100g/L), 2θ (5° a 70°).



Fonte: Autor (2022).

Figura 11. Espectro da difração de Raio-X da Biomembrana obtida em meio de maçã (concentração da maçã: 20% v/v, concentração de açúcar: 100g/L), 2θ (5° a 70°).



Fonte: Autor (2022).

A celulose é composta por uma mistura de fases I α e I β . Analisando as figuras, apresentam picos de difração em $14,8^\circ$, $17,5^\circ$ e $22,5^\circ$ sendo esse último o mais evidente, esses resultados foram aproximadamente o mesmo encontrado por Duarte, 2012. Os índices de cristalinidade para todas as películas foram bem próximos apresentando 80,5% para chá verde e 79,4% para maçã. De acordo com Tome, 2008 e Trovatti, 2011 a celulose bacteriana geralmente apresenta índice de cristalinidade entre 60 e 95%.

5.6 FTIR

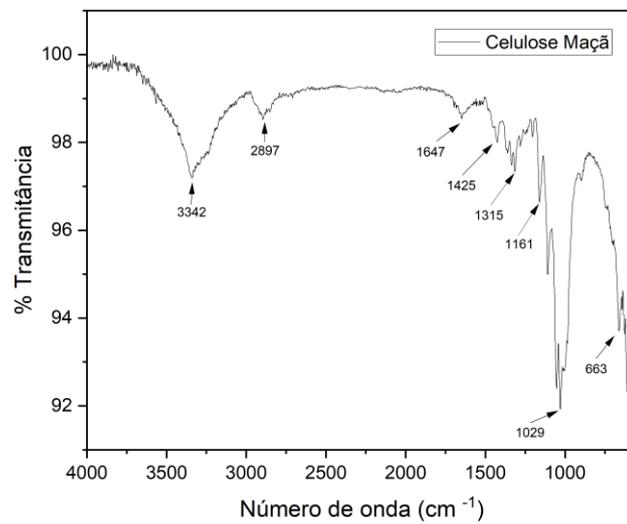
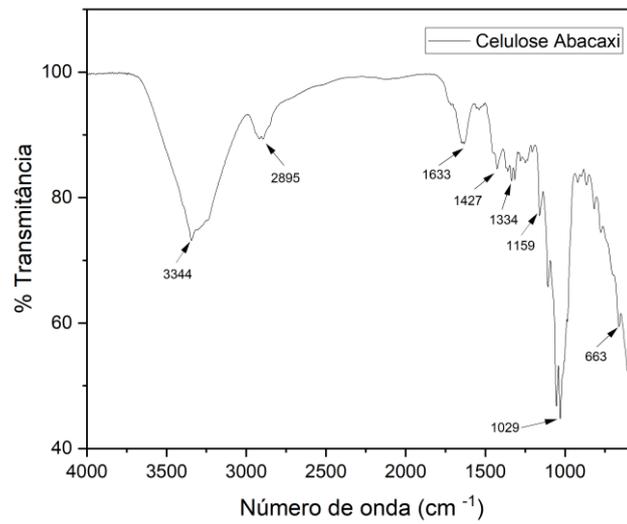
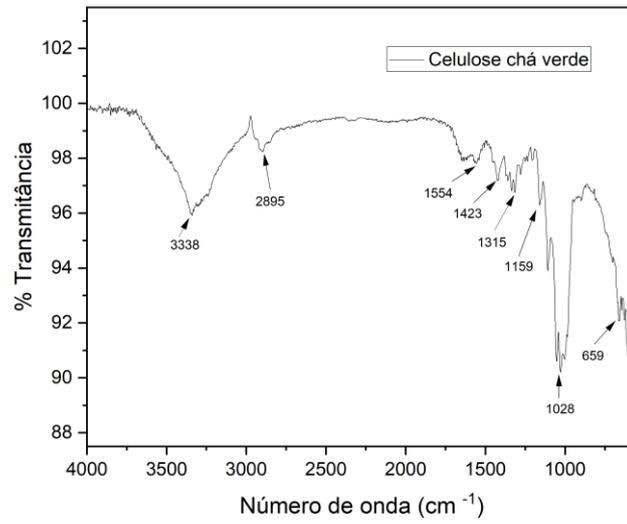
Os dados da espectroscopia infravermelho (FTIR) estão apresentados na Figura 11. em comprimento de onda de 4000 a 600 cm^{-1} , da celulose bacteriana obtida nos diferentes meios de cultivo. Os espectros mostram que os grupos funcionais da celulose são de fato encontrados nas membranas obtidas.

A região de 3338 , 3344 e 3342 cm^{-1} referem-se ao estiramento de grupos hidroxilas (OH) sendo característica da celulose tipo I; 2895 e 2897 cm^{-1} referente ao estiramento alcanos (CH) e estiramento assimétrico de metileno (CH_2) respectivamente, também característica da celulose. Os espectros 1554 , 1633 e 1647 cm^{-1} são característicos da presença do grupo carbonila. Resultados próximo foram

encontrados por Leonarski (2021) com bandas típicas de celulose bacteriana com transmissão próximo a 3350 cm^{-1} referente ao grupo hidroxilas, 2900 cm^{-1} trecho de CH, (CH₂ e CH₃), 1630 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} relacionado ao grupo carbonila da glicose, esses resultados foram obtidos em celulose bacteriana obtida a partir da fermentação de Kombuchá em subproduto de acerola. Espectros próximos a 1650 cm^{-1} formado por um pico menos intenso representa o estiramento C=C.

Pecoraro et al (2008) relatou frequências $1430 - 1330\text{ cm}^{-1}$ representando flexão angula de C-OH e CH, as regiões identificadas neste trabalho onde os espectros de 1423 , 1427 e 1425 cm^{-1} representam ligações H-C-H. As bandas 1315 e 1334 cm^{-1} sugere regiões cristalinas que são características de membranas bacterianas (ZHONG, 2020). Os espectros na região de 1159 e 1161 cm^{-1} referente a ligação glicosídica (C-O-C) e deformação CH. Presença de pico forte no espectro 1028 e 1029 cm^{-1} sugere estiramento C-O(-C-O-C). As absorções 659 e 663 cm^{-1} representam ligação fora do plano OH também relatadas por Pecoraro (2008).

Figura 12: FTIR das amostras de celulose bacteriana obtidas em meios de cultura chá verde, resíduos de abacaxi e maçã.



Fonte: Autor (2022).

As membranas de CB apresentadas mostraram semelhanças em seus espectros, que reforçam os espectros da celulose tipo I relatado em literatura. Com os dados obtidos também é possível identificar que o processo de purificação foi eficiente, não apresentando espectros de componentes residuais dos substratos utilizados para fermentação.

5.7 MEV

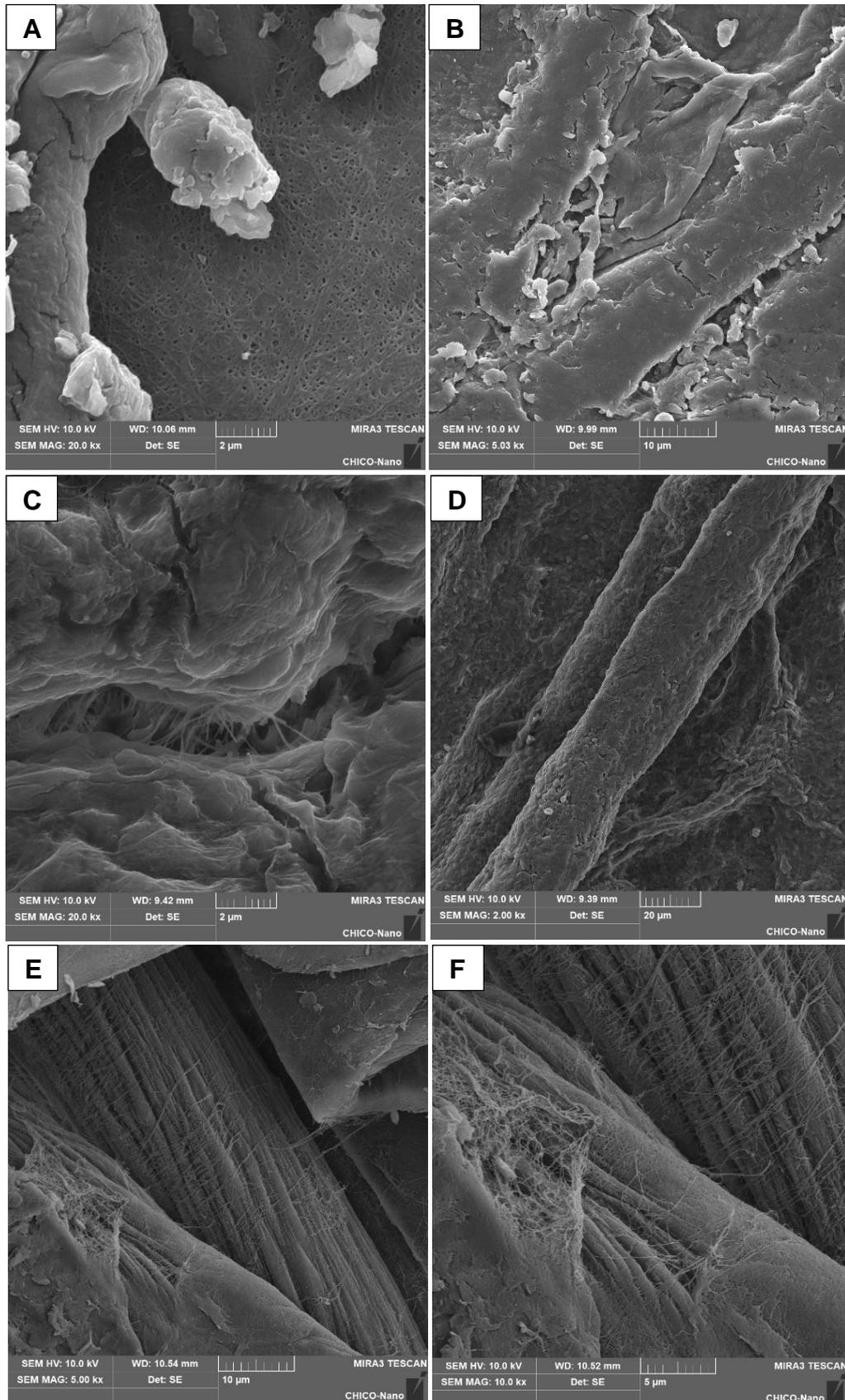
A celulose bacteriana é formada a partir de uma rede de fibrilas que se agregam formando microfibrilas e fibrilas macroscópicas (DING; ZHAO; ZENG, Y., 2014; MOON *et al.*, 2011). A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite a obtenção de imagens estruturais das amostras submetidas, sendo possível avaliar a estrutura morfológica das fibras de celulose bacteriana.

Na figura 12A de CB obtida da fermentação em chá verde, se pode verificar uma estrutura de matriz densa, com poucos espaços interfibrilares bem característico da superfície superior que fica em contato com o ar. Resultado também encontrado por Leonarski (2021), em celulose bacteriana produzida por bebida tipo Kombuchá a partir de subproduto de acerola como meio de cultivo.

É possível observar a celulose na sua forma desfibrilada presente na figura 12C de CB produzida em meio de abacaxi, isso ocorreu devido as amostras estarem na forma de pó. Imagem semelhante das fibras de celulose foi encontrada por Souza e Recouvreux (2016) em seu estudo de CB produzida por bactérias do gênero *Gluconacetobacter hansenii*.

Nas figuras 12E e 12F de CB produzida em meio de maçã, é possível visualizar uma rede de fibrilas de celulose bacteriana envolta nas fibrilas macroscópicas. As cadeias de nanofibrilas de celulose possui comportamento emaranhado e aglomerado. As micrografias mostram que a celulose obtida a partir da maçã possuem fibrilas mais porosas e a CB do Abacaxi possuem fibrilas macroscópicas mais densa. Em todas as amostras obtidas é possível observar a microestrutura da celulose bacteriana, sendo possível analisar que o tratamento utilizado para purificação foi eficiente visto que não foi encontrado células de microrganismos.

Figura 13: Micrografia Eletrônica de Varredura de celulose bacteriana obtida a partir da fermentação de Kombuchá em meios de cultivos alternativos: (A e B) CB controle chá verde; (C e D) CB Abacaxi e (E e F) CB Maçã.



Fonte:Autor(2022).

5.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Nas concentrações variando de 0,0 a 12,0 mg/mL não foi encontrada a determinação da CIM para a celulose frente aos microrganismos testes. Contudo, na tabela 3, é possível observar o índice de inibição de viabilidade de cada microrganismo teste frente a diferentes concentrações da solução de celulose, verifica-se que a celulose manteve uma inibição acima de 65% para todas as concentrações e microrganismos avaliados, sendo a inibição concentração dependente. A concentração de 12mg/ml apresentou os maiores percentuais de inibição. Diante dos resultados obtidos acredita-se que com aumento da concentração de celulose será possível se determinar a CIM.

Tabela 3: Índice de viabilidade de microrganismo patogênicos frente a solução de celulose da Kombuchá em diferentes concentrações. Resultado apresentado em percentagem (%).

Celulose bacteriana	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>
12 mg/ml	88,3±1,38	81,3±1,0	97,5±0,7	80,0±2,0	83,9±0,5	86,3±0,6
10 mg/ml	81,5±4,1	82,8±0,8	88,0±4,3	77,8±3,2	81,2±5,8	86,0±5,8
8 mg/ml	81,1±5,6	78,5±2,0	89,0±1,4	74,8±2,3	82,3±3,6	72,1±12,5
6 mg/ml	73,5±1,5	79,00±0,1	85,6±0,3	69,8±0,4	75,7±0,6	80,9±0,0
5 mg/ml	73,4±1,1	67,8±2,6	82,1±0,5	67,2±1,2	71,9±1,7	68,1±1,0
2 mg/ml	67,9±3,4	68,9±8,1	77,2±0,9	65,9±1,1	71,3±8,6	65,4±2,5

Fonte: Autor (2022).

6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Diante do exposto, pode-se observar que o uso de substratos alternativos para obtenção de celulose bacteriana possui um potencial promissor, sendo ainda necessários alguns ajustes no pH e no enriquecimento com nitrogênio, para obtenção de uma melhor produção. Outro ponto promissor é a reutilização de matérias que seriam descartados poluindo a natureza, direcionando dessa forma a outras finalidades preservando o meio ambiente.

A partir dos estudos obtidos através da fermentação de Kombuchá nos substratos alternativos foi possível verificar o crescimento de película celulósica de forma eficiente. As análises de DRX, FTIR e MEV permitem concluir que a CB obtida possui o grau de cristalinidade esperada e estrutura características da celulose bacteriana já utilizada.

O baixo custo dos materiais utilizados e os resultados obtidos se tornam atrativos para a continuidade das pesquisas, sendo necessário comparar a produção de celulose em meio HS com a produção em meios alternativos, verificando a viabilidade financeira de produção em escala industrial.

Sugere-se nos próximos estudos viabilizar o enriquecimento do substrato para obtenção de um melhor resultado de produção de CB. E estudar a degradação da biomembrana simulando o meio ambiente.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. 18 ed. Maryland: AOAC, 2002.

AYED, Lamia; HAMDY, Moktar. Manufacture of a beverage from cactus pear juice using “tea fungus” fermentation. **Annals Of Microbiology**, [s.l.], v. 65, n. 4, p.2293-2299, 27 mar. 2015. Springer Science and Business Media LLC.

BLAETH, C. M. Kombucha: tecnologia e produção. 2019. 53 f. **Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (Bacharelado em Nutrição)** - Bacharel, [S. l.], 2019.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha em todo território nacional (**Instrução Normativa nº 41/2019, de 17 de setembro de 2019**). Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2019.

CACICEDO, Maximiliano L. et al. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource technology**, v. 213, p. 172-180, 2016.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BERHOW, M.; MANDARINO, J. M. G.; OLIVEIRA, M. C. N. Environmental and genetic variation of isoflavones content of soybean seeds grown in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1444-1451, 2009.

CHAKRAVORTY, Somnath et al. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 220, p.63-72, mar. 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; **Approved Standard—Twelfth Edition**. CLSI document M02-A12, 2015.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. **CLSI document M100-S25**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. DUFRESNE C., FARNWORTH E. 2000. Tea, Kombucha, and health: a review. **Food Research International**, 33(6): 409-21.

COIMBRA, C. G. de O. Produção de celulose bacteriana por *Gluconacetobacter xylinus* e elaboração de filmes comestíveis. 2016. 139f. **Tese (Doutorado em Biotecnologia RENORBIO)** – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

DE AMORIM, J.D.P., DA SILVA JÚNIOR, C.J.G., COSTA, A.F.S., DE MELO, J.F.H., & SARUBBO, L.A. (2019). Avaliação do potencial de celulose bacteriana para aplicação em cosméticos. **Brazilian Journal of Development**, 5(10), 18457-18462.

DIAZ, A. B. et al. Modelling of different enzyme productions by solid-state fermentation on several agro-industrial residues. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 22, p. 9555–9566, 2016.

DING, S. Y.; ZHAO, S.; ZENG, Y. Size, shape, and arrangement of native cellulose fibrils in maize cell walls. **Cellulose**, 2014. v. 21, n. 2, p. 863–871.

DUARTE, Eden Batista; FEITOSA, Judith Pessoa de Andrade; ROSA, Morsyleide de Freitas; BORGES, Maria de Fátima; SOUZA FILHO, Men de Sá Moreira de. Caracterização de celulose bacteriana obtida a partir de resíduos agroindustriais. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 20º.**, 04 a 08 nov. 2012, Joinville, Santa Catarina, Brasil. Anais[...] Joinville, Santa Catarina, 2012.

EL-SALAM, S. S. A. Bacterial Cellulose of Kombucha Mushroom Tea. **New York Science Journal**, [s. l.], ano 2012, ed. 4, p. 1-7.

EMILJANOWICZ, K. E., & MALINOWSKA-PA'NCZYK, E. (2019). Kombucha from alternative raw materials – the review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 1–10.

FANG, Y., TUNG, M. A., BRITT, I. J., YADA, S., & DALGLEISH, D. G. Tensile and barrier properties of edible films made from whey proteins. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1, p. 188-193, 2002.

FAO. Desperdício de alimentos tem consequências no clima, na água, na terra e na biodiversidade. **Disponível em: <http://www.fao.org.br/dacatb.asp>**. Acesso em: 10 de Julho de 2022.

FILLIPPIS, Francesca de *et.al.* Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. **Food Microbiology**, v. 73, p. 11-16, ago. 2018. DOI:10.1016/j.fm.2018.01.008.

GIALAMAS, H, ZINOVIADOU, K.G., BILIADERIS, C.G., KOUTSOUMANIS, K.P., 2010. Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Research International**, 43, 2402-2408.

HANA, Y.; LIU, E.; LIU, L.; ZHANG, B.; WANG, Y.; GUI, M.; WU, R.; LI, P. Rheological, emulsifying and thermostability properties of two exopolysaccharides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 230-237, 2015.

IAL, INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985. Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, 3 ed., 1, 288p.

JAYABALAN R., MALBAŠA R.V., LONČAR E.S., VITAS J.S., SATHISHKUMAR M. 2014. A Review on Kombucha Tea – Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 13(4): 538-50.

JAYABALAN, R., SUBATHRADEVI, P., MARIMUTHU, S., SATHISHKUMAR, M., & SWAMINATHAN, K. (2008). Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. **Food Chemistry**, 109, 227–234

KAUFMANN K. 2013. Kombucha Rediscovered: The Medicinal Benefits of an Ancient Healing Tea. **Books Alive**, Tennessee, EUA. ISBN: 9780920470763 [ebook].

KESHK, S. M. A. S. Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, 99, 98–100, 2014.

LIMA, H. L. S.; NASCIMENTO, E. S.; ANDRADE, F. K.; BRÍGIDA, A. I. S.; BORGES, M. F.; CASSALES, A. R.; MUNIZ, C. R.; SOUZA Filho, M. de S. M.; MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. de F. Produção de Celulose Bacteriana por *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 Uso de Suco de Sisal - Um Resíduo Agroindustrial. **J. Chem. Eng.**, São Paulo, v.34, n.3, p. 671-680, 2017.

MAPA. Projeções do Agronegócio: Brasil 2017/18 a 2027/28 projeções de longo prazo: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Secretaria de Política Agrícola**. – Brasília: MAPA/ACE. [s.l.: s.n.].

MARZO, C. et al. Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. **Waste Management and Research**, v. 37, n. 2, p. 149–156, 2019.

MOON, R. J. *et al.* Cellulose nanomaterials review: Structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reviews**, 2011. v. 40, n. 7, p. 3941–3994.

MORADI, M., TAJIK, H., ROHANI, S. M. R., OROMIEHIE, A. R., MALEKINEJAD, H., ALIAKBARLU, J., & HADIAN, M. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. **LWT-Food Science and Technology**, v. 46, p. 477-484, 2012.

OLIVEIRA, C.S., GRDEN, L., RIBEIRO, M.C.O., 2007. Utilização de filmes comestíveis em alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPE, **série em ciência e tecnologia dos alimentos: Desenvolvimentos em Tecnologia dos Alimentos**, 01, 52-57.

PECORARO, É. *et al.* Bacterial Cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: Preparation. Properties and Applications. In: BELGACEM; GANDINI (Eds.). **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. Amsterdam: Elsevier. 2008. p. 289–304.

RIGO, L. N. **Desenvolvimento e caracterização de filmes comestíveis**. 2006. 130 f. Dissertação de Mestrado (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Mestre, [S. l.], 2006.

SCHALCHLI, H. et al. Production of ligninolytic enzymes and some diffusible antifungal compounds by white-rot fungi using potato solid wastes as the sole nutrient source. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, n. 1, p. 42–49, 2016.

SANTOS, M. J. Kombucha: Caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração. **Dissertação: FCT**, 2016.

SAMBROOK J., RUSSEL W.D. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual – Volume 2, 3ª edição, págs. 8.4-8.17, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Nova Iorque, EUA. ISBN: 0879695765.

SHADE, A. The Kombucha Biofilm: a Model System for Microbial Ecology. **Gordon and Betty Moore Foundation Fellow of the Life Sciences Research Foundation Yale University**, Yale University, ano 2011, p. 1-19, 27 jul. 2011.

SHARMA, Chhavi, BHARDWAJ, Nishi K. Biotransformation of fermented black tea into bacterial nanocellulose via symbiotic interplay of microorganisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 166-177, 1 jul. 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.202.

SINGH nee' NIGAM, P., PANDEY, A. (Editors), **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization**, Springer Science+ Business Media, 2009.

SRIPLAI, N., & PINITSOONTORN, S. (2020). Bacterial Cellulose - based Magnetic Nanocomposites: **A Review. Carbohydrate Polymers**, 254(117228), 1-55.

TEIXEIRA, M.F. Potencial tecnológico e nutricional de subprodutos do processamento de frutas/ Fernanda Teixeira Macagnan – 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/5735/MACAGNAN%2C%20FERNANDA%20TEIXEIRA.pdf?sequence=1&isAllowed=y> . Acesso em: 02 de novembro de 2020.

VITAS, Jasmina et al. The antioxidant activity of kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory. *Chemical Industry And Chemical Engineering Quarterly*, [s.l.], v. 19, n. 1, p.129-139, 2013. **National Library of Serbia**.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1801-1812, 1999.

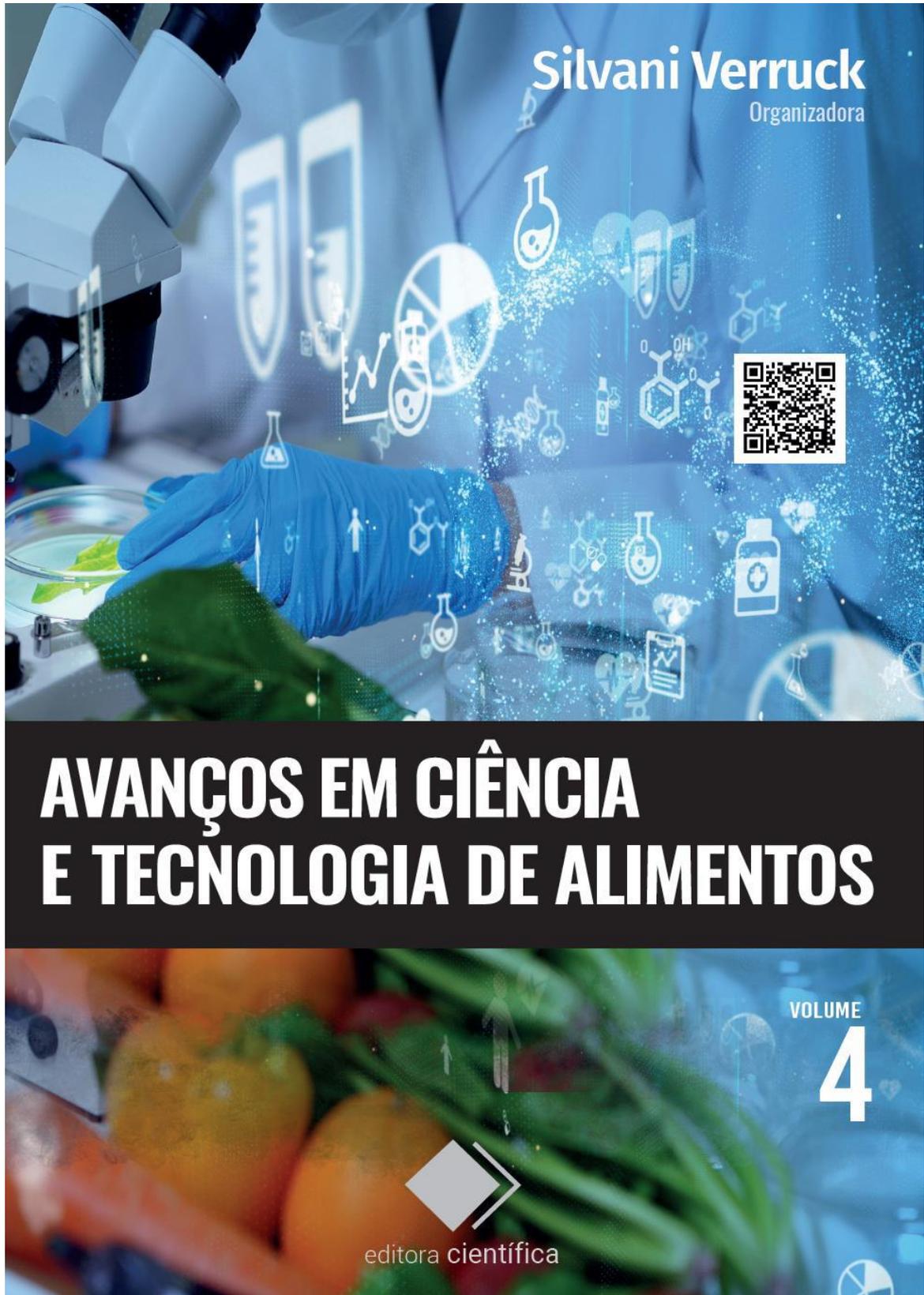
YANG, L.; PAULSON, A.T. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. **Food Research International**, v. 33, n.7, p.571-578, 2000.

ZHAO, H.; LI, J.; ZHU, K. Bacterial Cellulose Production from Waste products and 65 Fermentation conditions optimization. **IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering**, v. 394, p. 1-6. 2018. Doi:10.1088/1757-899X/394/2/022041.

ZUBAIDAH, Elok et al. Potential of snake fruit (*Salacca zalacca* (Gaerth.) Voss) for the development of a beverage through fermentation with the Kombucha consortium. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 13, p.198-203, jan. 2018.

ZHONG, C. Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. December, p. 1–19, 2020.

ANEXO A – CAPA DA REVISTA AVANÇOS EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.



ANEXO B – CAPÍTULO DE LIVRO INTITULADO: KOMBUCHÁ: DO “CHÁ DA IMORTALIDADE” A PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA.

04

“

Kombuchá: do “chá da imortalidade” a produção de celulose bacteriana

- | Daniella Pereira da **Silva**
UFPE
- | Thayza Christina Montenegro **Stamford**
UFPE
- | Felipe Ravelly Alves de **Souza**
UFPE
- | Erilane de Castro Lima **Machado**
UFPE - CAV
- | Tania Lúcia Montenegro **Stamford**
UFPE

**ANEXO C – CAPÍTULO DE LIVRO INTITULADO: BIOPOLIMEROS NA
INDUSTRIA DE ALIMENTOS: DO APROVEITAMENTO DE RESÍDUPS
AGROINDUSTRIAIS A PRODUÇÃO DE BIOPOLIMEROS.**

24

“

Biopolimeros na indústria de alimentos: do aproveitamento de resíduos agroindustriais a produção de biopolimeros

- | Felipe Ravelly Alves de **Souza**
PPGBIOTEC/UFPE
- | José Sebastião Thiego de **Oliveira**
PPGBIOTEC/UFPE
- | Daniella Pereira da **Silva**
PPGBIOTEC/UFPE
- | Michelle Galindo de **Oliveira**
CAV/UFPE
- | Danielle Dias **Neves**
UFRPE
- | Wagner Eduardo da **Silva**
UFRPE
- | Thayza Christina Montenegro **Stamford**
UFPE